



TITLE:

〔第2報〕結核菌の試験管内発育に及ぼす各種蛋白分画の影響(結核免疫における血清蛋白の意義)

AUTHOR(S):

辻, 純子

CITATION:

辻, 純子. 〔第2報〕結核菌の試験管内発育に及ぼす各種蛋白分画の影響(結核免疫における血清蛋白の意義). 京都大学結核研究所紀要 1960, 9(1): 6-11

ISSUE DATE:

1960-09

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/51933>

RIGHT:

結核免疫における血清蛋白の意義

〔第2報〕 結核菌の試験管内発育に及ぼす 各種蛋白分画の影響

京都大学結核研究所第5部（主任 教授 辻 周介）

辻（旧姓 武岡）純 子

前報において、家兎を生菌又は死菌ワクチンを以て充分に免疫した場合その動物の血清に著明な抗結核菌作用の発現することを示した。更に、この抗菌作用は正常家兎血清に存在する結核菌発育促進作用が免疫の場合に低下するためであることをも証明した。同様の所見は、モルモットを用いても認められた。

本報においては、正常及免疫血清の夫々の蛋白分画の結核菌の試験管内発育に及ぼす影響について報告する。

実験材料及び方法

a) 血清蛋白分画法

H. G. Kunkel¹⁾の記載による澱粉カラムを用いての Zone electrophoresis を行った。澱粉は使用前に蒸留水を以て充分に洗滌し、不溶性澱粉を乾燥粉末として保存しておく。

電気泳動は次の条件で 4°C 24時間行った。ペロナールアセテート緩衝液(pH8.6 $\mu=0.05$), 250—300V, 2mA/cm²。

泳動終了後、カラムを長さ 1cm ずつの小片に載断し、各片夫々 10ml の生塩水を入れた試験管に投入する。4°C, 24~48時間、時々振盪しながら蛋白の抽出を行う。

抽出蛋白液の 0.2ml を以て Folin-Ciocalteu²⁾の方法により発色せしめる。方法は次の如くである。2%に無水 Na₂CO₃ を溶有せる 0.1N NaOH 液 200ml に 4ml の 0.5% CuSO₄ 液を混ぜると僅かの白濁を呈するのでよく之を振盪混和した後、この 3.5ml を入れた試験管に 0.2ml の被検液と 0.1ml の Folin-Ciocalteu の試薬を注入すると青く発色する。電気

比色計を以てこの色を比色し、値をプロットして血清蛋白の分布曲線を作成するのである。

かくて得られた曲線を基として、抽出蛋白液から、Albumin, α -, β -, γ -Globulin の各分画を分離採取し夫々セロファン囊を通して Carbowax 1500³⁾ に対して数時間透析して蛋白を適当に濃縮する。この透析の間に、Carbowax 分子がセロファン膜を通して侵入する可能性はあるが、予備実験としてその程度の Carbowax の濃度では H37Rv 菌の試験管内発育に何の影響もないことを確めてある。それよりも、Carbowax の混入のために蛋白濃度の測定の際の屈折計の読みが妨げられるので、何か別の方法で蛋白濃度の補正をする必要がある。多くの場合に、Folin 試薬を用いて補正を行った。

得られた蛋白液は生塩水を用いて 10mg/ml の濃度に稀釈し、Seitz で滅菌後結核菌の試験管内発育に及ぼす影響を検した。

b) 培 地

同一蛋白液を用いて2種の培地を作成した。(1)は 1ml の蛋白液と 1ml の Kirchner 原液を混ぜたもので之を O-培地と呼ぶ。(2)は 1ml の同じ蛋白液に 1ml の Kirchner 原液及び 0.3ml の榮研牛 Albumin を加えたもので之を A-培地と呼ぶ。(第1表)

O-培地では、Albumin を含まない Kirchner 原液のみの深部ではスライド塗抹結核菌は発育し得ないので、加えた蛋白の結核菌発育増進作用の有無の検定に適している。A-培地では、培地そのままで H37Rv 菌の培養に好適であり、従って加えた蛋白の菌発育抑制作用の検定に適しているのである。

培養は SCM⁴⁾ を用い、蛋白液の階段稀釈したものによってその影響を判定した。

第 1 表

	Sample for testing	Kirchner's liquid, double concentrated	Eiken's bovine albumin	Purpose
A-medium	1.0 ml	1.0 ml	0.3 ml	Determination of tuberculo-inhibiting property
O-medium	1.0 ml	1.0 ml	—	Determination of tuberculo-promoting property

実 験 結 果

A) 各種正常動物血清

a) 健康人血清

健康人血清を用いての実験結果は第2表に示す如くである。O-培地中では、Albumin 分画は1/2~1/32の濃度において常に H37 Rv 菌の発育を増進している。しかるに、一定以上の濃度(1/2及び原液)ではこの作用は減退乃至消失す

ることは注目に値する。 α -, β -, 及び γ -Globulin 分画は O- 培地での発育増進作用を認めない。A- 培地では、どの分画も 1/4 の濃度以下では抗結核菌作用を示さない。Albumin はその原濃度で、又 γ -Globulin はその原濃度及び 1/2 で結核菌発育抑制作用を示している。

b) 正常牛血清

結果は第3表に示す如く、第2表に示した結果とよく似ている。Albumin 分画は、作用とし

第 2 表

Effect of Each Fraction Separated from Normal Healthy Human Serum on the Growth of H37Rv Strain *in vitro*

Culture media		O-medium							A-medium						
Fraction of protein	Concentration	Original	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	Original	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
Albumin		—	+	++	++	++	++	—	+	++	++	++	++	++	++
α -Globulin			—	—	—	—	—	—		++	++	++	++	++	++
β -Globulin			—	—	—	—	—	—		++	++	++	++	++	++
γ -Globulin		—	—	—	—	—	—	—	—	+	++	++	++	++	++

Control: ++ (H37Rv strain cultured by SCM in the Kirchner's serum-medium for 10 days).

第 3 表

Effect of Each Fraction Separated from Normal Bovine Serum on the Growth of H37Rv Strain *in vitro*

Culture media		O-medium							A-medium						
Fraction of protein	Concentration	Original	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	Original	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
Albumin		—	+	++	++	+	—	—	+	+	++	++	++	++	++
α -Globulin				—	—	—	—	—			++	++	++	++	++
β -Globulin				—	—	—	—	—			++	++	++	++	++
γ -Globulin		—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	++	++	++	++

Control: ++ (H37Rv strain cultured by SCM in the Kirchner's serum-medium for 10 days).

ではやゝ人血清の場合よりは弱い様であるけれども、やはりO-培地での菌発育増進作用のあることが分る。且つ、他の分画には斯かる作用はない。又濃厚な Albumin では菌発育増進作用が低下することも同様である。又濃厚な Albumin 及び γ -Globulin が抗結核菌作用を有することも認められた。

c) 正常家兎血清

第4表に示す如く、この場合も上記の結果と同様である。

d) 正常モルモット血清

第5表の如く、他の正常動物血清の場合と全く同傾向の結果を得た。

以上正常血清を用いての諸実験の結果次の如く結論することが出来よう。(1) Albumin 分画は正常血清蛋白の有する結核菌発育増進作用の

唯一の源である。(2) 発育増進作用は Albumin が一定以上濃厚な場合も又反対に一定以下に稀釈された場合のいずれも低下する。(3) Albumin 及び γ -Globulin分画は高濃度では、結核菌発育抑制作用を有する。(4) α -及び β -Globulin 分画は発育に対し全く無影響である。

B) 免疫家兎血清

a) 死菌ワクチンによる免疫血清

家兎を流パラ加熱死菌 H37Rv 100mg を以て2週間隔に2回免疫する。2週後ツベルクリン陽性を確かめて、血清を採取し、型の如く電気泳動により蛋白分画を分離する。各分画について、H37Rv 菌の発育に対する影響を検した結果が第6表である。

免疫血清と対照正常血清との唯一の差異は

第 4 表

Effect of Each Fraction Separated from Normal Rabbit Serum
on the Growth of H37Rv Strain *in vitro*

Culture media Fraction of protein	Concentration	O-medium							A-medium						
		Original	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	Original	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
Albumin		—	+	++	++	++	+	—	±	++	++	++	++	++	++
α -Globulin			—	—	—	—	—	—		++	++	++	++	++	++
β -Globulin			—	—	—	—	—	—		++	++	++	++	++	++
γ -Globulin		—	—	—	—	—	—	—	—	—	++	++	++	++	++

Control: ++ (H37Rv strain cultured by SCM in the Kirchner's serum-medium for 10 days).

第 5 表

Effect of Each Fraction Separated from Normal Guinea Pig Serum
on the Growth of H37Rv Strain *in vitro*

Culture media Fraction of protein	Concentration	O-medium							A-medium						
		Original	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	Original	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
Albumin		+	+	++	++	++	—	—	+	++	++	++	++	++	++
α -Globulin		—	—	—	—	—	—	—	++	++	++	++	++	++	++
β -Globulin		—	—	—	—	—	—	—	++	++	++	++	++	++	++
γ -Globulin		—	—	—	—	—	—	—	—	++	++	++	++	++	++

Control: ++ (H37Rv strain cultured by SCM in the Kirchner's serum-medium for 10 days)

第 6 表

Effect of Each Fraction Separated from Serum of Rabbit Immunized
with Dead H37Rv Strain on the Growth of H37Rv Strain *in vitro*

Culture media		O-medium						A-medium					
Fraction of protein	Concentration	Original	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	Original	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
Albumin	Immune	—	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+	+
	Control	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α -Globulin	Immune	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
	Control	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
β -Globulin	Immune	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
	Control	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
γ -Globulin	Immune	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+
	Control	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+

Control: + (H37Rv strain cultured by SCM in the Kirchner's serum-medium for 10 days).

Albumin 分画の態度にあることが表から明らかである。即ち免疫血清の Albumin の O-培地での菌発育増進作用は対照に比して著明に減退している。他の実験データはすべて免疫血清と正常血清と同様であつて差異を認めない。

b) 生菌 BCG ワクチンによる免疫血清

家兎を 3 群に分ち、第 1 群は 5mg、第 2 群は 50mg の BCG 生菌を以て免疫し、第 3 群を無処置の対照群とする。4 週後ツベルクリン陽性を確かめて、全採血し、血清を分画する。正常血清も同様にして分画する。

結果は第 7 表に示す。

正常 Albumin 分画に存在する O-培地での菌発育増進作用は、第 1 群及び第 2 群の Albumin では共に消失している。又 A-培地で認められる僅かの菌発育抑制作用は、免疫及び正常の γ -Globulin のいずれにおいても存在している。

以上の免疫家兎血清を用いての実験結果から、結論として次の事が言えるであろう。即ち、免疫処置によつて Albumin 分画の菌発育増進作用のみが影響をうけて其作用を低下するに反し、他の分画 α -, β -, γ -Globulin のいずれも影響を受けない。殊に興味深いことは、 γ -Globulin 分画の菌発育抑制作用が免疫によつて何ら

増加を示さないことである。この事は、免疫によつて γ -Globulin 中に抗体が増加したとしても、この抗体には結核菌発育抑制作用を欠くものと想像されるのである。

そこで果して血清抗体がどの分画にどの程度分布するかを知るために次の実験を行つた。この実験には、10mg 加熱死菌 H37Rv 1 週おき 3 回免疫した家兎の血清を用いた。

抗体の証明には、大原⁹⁾ その他の記載した沈降法を用い、抗原としては結核菌の水抽出物を用いた。方法の詳細は別に報告する。

結果は第 8 表の如くである。即ち、原血清では 64 倍迄又この血清の γ -Globulin では 16 倍迄沈降抗体を証明するが、他の血清分画では抗体は完全に陰性である。

以上の実験からして、抗体少くとも沈降抗体は γ -Globulin 分画にのみ存在することは明瞭である。しかも、免疫血清の γ -Globulin 分画は正常血清の γ -Globulin 分画と大差のない菌発育抑制作用しか有しないのである。従つて、この沈降抗体は結核菌の発育を *in vitro* で抑制し得る能力を持たないことは確実である。

考 按

正常血清では動物種が異つても、結核菌発育

第 7 表

Effect of Each Protein Fraction Separated from Serum of Rabbit Immunized with Living BCG Vaccine on the Growth of H37Rv Strain *in vitro*

Quantity of vaccine	Protein fraction	O-medium	A-medium
5 mg	Albumin	—	++
	α -Globulin	—	++
	β -Globulin	—	++
	γ -Globulin	—	+
50 mg	Albumin	—	++
	α -Globulin	—	++
	β -Globulin	—	++
	γ -Globulin	—	+
Non-immunized control	Albumin	++	++
	α -Globulin	—	++
	β -Globulin	—	++
	γ -Globulin	—	+

Control: ++ (H37Rv strain cultured by SCM in the Kirchner's serum-medium for 10 days).

第 8 表

Titers of Precipitating Antibody Contained in the Immune Rabbit Serum and in Protein Fraction Separated from this Serum

Titer of dilution	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
Protein fraction										
Albumin	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
α -Globulin	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
β -Globulin	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
γ -Globulin	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—
Parent serum	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—

増進作用の根源はたゞ Albumin 分画だけであり、Globulin 分画には全くその作用はない。Dubos and Middlebrook⁶⁾ も、Albumin は菌の増進を促進するに対し Globulin にはかゝる作用がないと報告した。又 Davis and Dubos⁷⁾ は牛 Albumin Fraction V は全血清又は結晶牛血清よりも促進作用がつよく、Globulin 分画には全くかゝる作用はないという。Youmans and Youmans⁸⁾ も牛血清分画の人型結核菌の発育に対する影響を *in vitro* で詳しく検討し、上述の

報告者とは異つて、全血清及び Prothrombin が最もよく発育を増進するが、Fibrinogen及び Ultrafiltrate を除く他の各分画もいずれも多少共促進作用を持っていると報告した。私の実験結果は Youmans の報告とは異り、殊に Globulin 分画の作用に関しては全く反対である。Globulin 分画は結核菌の発育に対し無影響であるか又は僅かに之を抑制するにすぎない。Boissevain⁹⁾ も我々と似た結果を報告している。

上述の諸学者の実験はすべて Cohn のエタノ

ール分画法による材料を用いているのであるが、エタノール処理により蛋白は自然の状態と異つて変性されているであろう。我々の Zone electrophoresis を用うる分画法は此点 Cohn の方法よりも変性が少ないものと考えられる。此意味で我々の実験結果の信頼性はより大であろうと考える。

Albumin 分画が、その高濃度の状態では結核菌発育増進作用が低下するばかりでなく、僅かではあるが菌発育を抑制することは注目値する所見である。この事は、Albumin 分画が単一系ではなく低濃度にではあるが何か他の抗結核菌性物質例えば Lysozyme の如き物が混在していることを疑わしめるのである。

免疫家兎血清の蛋白分画が正常血清蛋白以上に結核菌発育抑制作用を有するものでなく、ただ僅かに正常と同様に γ -Globulin にその作用があるに過ぎないことは興味ある事実と考える。結核菌の発育を免疫血清が正常血清よりも強く抑える能力の主な原因は、Albumin 分画の持つ菌発育増進作用の低下である。この低下が何によつてもたらせるかについては今日尚不明ではあるが、ある種の抗結核菌性物質、例えば Myrvik¹⁰⁾ の指適する Lysozyme の如きものが、免疫によつて Albumin 分画中に増加することによる可能性は考えられる。免疫血清の γ -Globulin 中には抗体少なくとも沈降抗体が存在しているが、この抗体は結核菌の発育には何の影響も及ぼさない。以上の所見は、結核免疫少なくとも家兎体液における免疫なる現象の本態は抗原抗体反応の立場からすると非特異的なものである。従つて、かゝる現象を「免疫」とは呼ばずに「獲得性抵抗力」と呼ぶ方が適當であると考えられる。

総 括

正常及び免疫家兎の血清蛋白を Zone electrophoresis の方法で分画し、4 分画に分離した。即ち、Albumin, α -, β -, 及び γ -Globulin 分画に分け、之等の各分画の毒力人型菌の試験管内発育に及ぼす影響を検した。

正常家兎の Albumin 分画は、菌増殖を増進し γ -Globulin 分画は僅かながら発育を抑制する。 α -及び β -分画は増進的にも亦抑制的にも作用しない。しかるに免疫すると、Albumin 分画の菌発育増進作用が著しく低下するが、Globulin 分画の菌に対する作用は正常無処置の場合と全く変りがない。この事から結核免疫に於ける特異的抗体の意義について論じた。

文 献

- 1) Kunkel, H. G. : Methods of Biochemical Analysis (Interscience Publishers. Inc.) 1 : 155, 1954.
- 2) Kabat, E.A. and Mayer, M.M. : Experimental Immunochemistry, (C. Thomas Publisher), Translated by T. Katsura 288, 1956.
- 3) 新井賢治他 : 生物物理化学, 3 巻, 56 頁, 昭和31.
- 4) Tsuji, S., Yamamoto, H. and Ito, K. : Japan. J. Tuberc. 2 : 238, 1954.
- 5) 大原達他 : 東京医事新誌, 68 巻, 5 頁, 昭26.
- 6) Dubos, R.J. and Middlebrook, G. : Am. Rev. Tuberc. 56 : 334, 1947.
- 7) Davis, B.D. and Dubos, R.J. : J. Bact. 55 : 11, 1948.
- 8) Youmans, A.S. and Youmans, G.P. : J. Bact. 60 : 561, 1950.
- 9) Boissevain, C.H. : Proc. Soc. Exp-Biol, & Med. 44 : 110, 1940.
- 10) Myrvik, Q.N. : Am. Rev. Tuber. 64 : 669, 1951.